

PEROXIDASAS EN *CYCAS CIRCINNALIS* L. I. ESTUDIOS EN LA SEMILLA

Esperanza Peña
Emma Grillo
Dalia Pérez
Jardín Botánico Nacional
Universidad de La Habana

RESUMEN

Se evaluaron las isoenzimas peroxidasas en tres grupos de semillas protospermas de *Cycas circinnalis* L. que corresponden a diferentes rangos en el desarrollo de la semilla. Para caracterizar los grupos se evaluaron las clorofilas, los carotenos y las antocianinas totales, así como los parámetros físicos. Existe una isoenzima peroxidasa asociada a la maduración de la semilla. Se discuten los resultados.

ABSTRACT

Peroxidase isoenzyme in protosperm seeds of *Cycas circinnalis* L. were evaluated in three groups which correspond to different ranges of seed development. Total chlorophylls, carotenoids and anthocyanins, as physical parameters were evaluated to characterize the groups. A peroxidase isoenzyme is related to maturation of the seed. Results are discussed.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe ya un gran número de trabajos en que se estudia el polimorfismo enzimático en especies vegetales. La amplia distribución de la enzima peroxidasa (E.C.1.11.7.) y sus distintas formas moleculares ha sido reportada (Shannon, 1968), y la gran cantidad de isoenzimas encontradas permite pensar en la posibilidad de su participación en muchas reacciones no determinadas hasta el presente (Scandalios, 1974).

Las funciones en que están implicadas las peroxidosas también han sido discutidas por distintos autores. Su participación en la degradación del ácido indolacético (AIA) las relaciona a la regulación del crecimiento y desarrollo en las plantas (Galston, Bonner y Baker, 1953; Ray, 1958; Mc Cune, 1961; Fox, Nakada y Purves, 1964; Galston, Lavee y Siegel, 1967; Siegel y Galston, 1967 y Cunningham y cols., 1975, entre otros).

Se han reportado variaciones en las formas moleculares de peroxidosas asociadas a la resistencia a enfermedades (Rudolph y Stahmann, 1964; Farkas y Stahmann, 1966; Johnson y Cunningham, 1972), a la formación de lignina (Siegel, 1953; Higuchi, 1957; Burria, 1960); a la aparición de daños en los tejidos (Bireka y Miller, 1974); y a la maduración de algunos frutos (Matoo y Modi, 1969; Vendrell, 1969; Ku, Yang y Pratt, 1970; González, 1980).

También algunos autores reportan variaciones en la viabilidad del polen y de las semillas en algunas especies (Hamill y Browbaker, 1969) y con el crecimiento y diferenciación de líneas de callos embriogénicos y no embriogénicos

(Kochba, Lavee y Spiegel-Roy, 1977).

Los trabajos realizados han sido llevados a cabo en plantas con flores y hasta el presente no se conoce el comportamiento de la enzima en *Cycadaceae*, grupo de plantas primitivas con semillas protospermas. En el presente trabajo se analizan la presencia y características de las peroxidases en distintas partes de la semilla de *Cycas circinnalis* L. agrupadas según sus parámetros físicos y se establecen las correlaciones de las mencionadas enzimas con su contenido en pigmentos.

MATERIALES Y METODOS

A. *Material utilizado*

Se colectaron semillas de *Cycas circinnalis* L. procedentes de plantas cultivadas en el Jardín Botánico Nacional en el mes de octubre, las cuales fueron separadas en tres grupos atendiendo al peso, tamaño y color como se presenta en la Tabla I que aparece a continuación.

TABLA I. Parámetros físicos de las semillas de *Cycas circinnalis* L. Los datos que aparecen en la tabla son el resultado de los promedios de 40 semillas de cada uno de los grupos.

GRUPOS	PARAMETROS FISICOS	PESO (en gN)	ALTURA (en cm)	ANCHO (en cm)	COLORACION
1		2,51	1,5	1,5	VERDE INTENSO
2		33,56	4,23	3,58	VERDE CLARO
3		69,80	5,03	4,59	VERDE AMA- RILLENTO CON ZONAS PARDAS

Inmediatamente después de analizar los parámetros físicos se procedió a separar el tegumento externo y el gametofito de cada semilla y se desecharon los tegumentos internos.

B. Preparación de las muestras para electroforesis

1. Tegumento externo: Se pesaron 5 g de tegumento de cada grupo de semillas; se maceraron con 5 ml de sacarosa al 2%; se filtraron por gasa y se centrifugaron los extractos a 6000 rpm durante 10', descartándose el precipitado de cada uno hasta su utilización.
2. Gametofito: Se pesaron 40 g de gametofitos de los grupos 2 y 3, ya que en el grupo 1 no existían; se maceraron con 5 ml de sacarosa al 2%; se centrifugaron a 7000 rpm durante 15', descartándose el precipitado. Los sobrenadantes se congelaron hasta su utilización.

C. Evaluación de isoenzimas peroxidadas

Las isoenzimas peroxidadas fueron evaluadas mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida (Raymond, 1964) en un aparato de electroforesis vertical simplificado (Chapel y cols, 1974) utilizando buffer de tris-glicina 0.04 M de pH 8.3. Para identificar el frente de corrida se utilizó una solución de azul de bromofenol. Las corridas se llevaron a cabo a una temperatura de 15°C y se utilizó una intensidad de corriente de 50 mA. El tiempo de corrida se determinó por el desplazamiento de la banda de Kohlrausch. El revelado de los geles se realizó con bencidina dihidroclórica en ácido acético al 14%

mezclados antes de usarse con peróxido de hidrógeno durante 1'. Después de lavados los geles con agua destilada y mantenidos en ácido acético al 7%, se realizaron los zimogramas.

D. Determinación de pigmentos en el tegumento externo de las semillas

Se separaron los pigmentos presentes en el tegumento externo de las semillas de *Cycas circinnalis* L. en los grupos 1, 2 y 3, partiendo de 5 grs de tegumento y siguiendo la marcha analítica propuesta por Gortner (1965). Las soluciones de clorofilas, carotenoides y antocianinas se evaluaron en un espectrocolorímetro Spekol a 665, 448 y 517 nm respectivamente, determinando se su densidad óptica.

RESULTADOS

En la figura 1 se presenta el zimograma correspondiente a una corrida electroforética de los gametofitos y los tegumentos de los grupos de semillas utilizados.

Como se observa en el zimograma, en los gametofitos no se presentan bandas de peroxidasas mientras que en los tegumentos externos sí. Los tres grupos de tegumento externo presentan una forma molecular de peroxidasa común que se localiza entre 2,0 y 2,5 cm del punto de aplicación de la muestra, aunque la intensidad de la banda difiere aumentando del grupo 1 al 3. En el grupo 3 de tegumento, se resuelve una banda intensa adicional, localizada entre 5,1 y 6,0 cm del punto de aplicación.

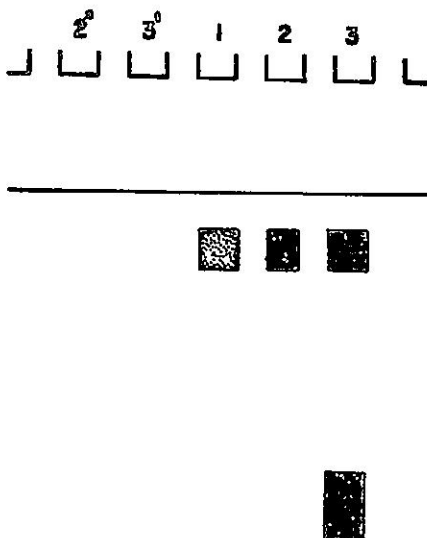


Fig. 1. Zimograma de electroforesis para peroxidadas en gametofitos (2' y 3') y tegumentos externos (1, 2 y 3).

La dilución de la muestra de tegumento externo correspondiente a las semillas del grupo 3, con el objetivo de lograr una mayor resolución de bandas, no dio resultados diferentes. Los resultados relativos al contenido de pigmentos en el tegumento externo de los distintos grupos de semillas se presentan en la Tabla II.

Se observa una diferencia en el contenido de pigmentos en relación con los grupos de semillas analizados. Las clorofilas totales disminuyen del grupo 1 al 3 mientras que en las antocianinas el comportamiento es inverso. El menor contenido de carotenoides se presenta en el grupo 1, el mayor en el grupo 2 y el grupo 3 presenta un valor intermedio.

TABLA II. Contenido de pigmentos en el tegumento externo de las semillas de *Cycas circinnalis* L. Los datos que se reflejan se expresan en términos de D.O.

PIGMENTOS GRUPOS	CLOROFILAS	CAROTENOIDES	ANTOCIANINAS
1	0,255	0,185	0,10
2	0,22	0,30	0,14
3	0,06	0,265	0,27

DISCUSIÓN

Actualmente los resultados obtenidos en la caracterización de isoenzimas peroxidasa por electroforesis están sujetos a comprobación. Si las formas moleculares separables por este método son "isoenzimas" o "aloenzimas" sólo puede conocerse realmente después de estudiar su modo de herencia (Markert y Moller, 1959; Prakash, Lewontin y Hubby, 1969). La peroxidasa es una proteína monomérica, formada de una sola cadena polipeptídica y está codificada por un gen estructural simple. Algunas de las formas moleculares separables pueden ser entonces el resultado de la unión posterior de grupos prostéticos, azúcares libres y/o aminados para constituir isoenzimas o ser sustituciones de nucleótidos en el gen estructural en cuyo caso sería aloenzimas.

En los grupos de semillas de *Cycas circinnalis* L. analizados se han encontrado dos formas moleculares diferentes de la enzima peroxidasa, una de las cuales es característica del tegumento externo de las semillas del grupo 3. Esto no excluye la posibilidad de que separando el material en un mayor número de grupos entre los originales 2 y 3, pueda determinarse si existe una adición o una sustitución de una forma de peroxidasa por otra asociada al proceso de maduración de las semillas. No obstante, puede decirse que existe una banda adicional asociada al proceso de maduración de estas semillas. Por otra parte, existe la posibilidad de que en otros órganos de la planta se presenten formas distintas de peroxidasa a las encontradas en el tegumento externo de las semillas.

Es de señalar que en los gametofitos (endospermo primario de las semillas) no se hayan encontrado isoenzimas peroxidasas. El análisis de pigmentos efectuado a los grupos de semillas muestreados refleja la presencia de clorofilas, carotenoides y antocianinas en el tegumento externo de las mismas. El comportamiento del contenido de pigmentos en cuanto a las variaciones durante su desarrollo en la especie estudiada es comparable al de la mayoría de los epicarpios de los frutos en las plantas con flores.

En los frutos, el estado de desarrollo está relacionado al metabolismo de los pigmentos vegetales. En el caso de estas semillas protospermas se observa cómo las clorofilas van disminuyendo mientras que los carotenoides van aumentando. El hecho de que los carotenoides presenten el valor más alto en las semillas del grupo 2 y no en las del grupo 3, no resulta contradictorio si se tienen en cuenta que las semillas de este último grupo tenían gran cantidad de zonas de color pardo como resultado de la salida a la superficie de compuestos resinosos. Esto también puede estar relacionado al brusco descenso en las clorofilas de las semillas del grupo 3.

En el estudio realizado no se tomaron semillas en sus últimas fases de desarrollo por lo que no puede analizarse el decremento que ocurre finalmente en el contenido de todos los pigmentos.

Los parámetros físicos tomados en consideración para separar los grupos de semillas así como el comportamiento de los pigmentos analizados nos permiten caracterizar tres rangos en el desarrollo de la semilla de *Cycas circinnalis* L.

Las supuestas semillas del grupo 1 parecen corresponderse con macroesporangios en los cuales no hubo desarrollo ulterior hasta la formación del gametofito con las estructuras reproductoras correspondientes, o en los cuales no se produjo la fecundación y la estructura finalmente degeneró (Coulter y Chamberlain, 1901; Chamberlain, 1919). No obstante, aún no se han producido cambios de pigmentos que se relacionen a la degeneración de las paredes del macroesporangio.

El grupo 2 está formado por semillas en crecimiento, no maduras aún, y el grupo 3 contiene semillas que han comenzado su fase de maduración.

Dado que los enzimas cambian durante el desarrollo (Shannon, 1968) y que el patrón de la enzima puede variar durante los procesos de maduración (Ku, Yang y Pratt, 1970) por la catálisis de la oxidación de fenoles y anillos aromáticos en general, los resultados obtenidos en la variación del patrón de peroxidasas en el tegumento externo, conjuntamente a los cambios en el contenido de pigmentos, pueden asociarse a la fase de maduración de la semilla de *Cycas circinnalis* L. La maduración del endospermo primario de la semilla sin embargo no parece relacionarse a las peroxidasas.

Aunque este trabajo constituye un aporte al conocimiento acerca de algunos cambios en las peroxidasas asociados a la maduración de una semilla protosperma, resultaría importante conocer las variaciones de este sistema así como la correlación con la variación de pigmentos en todo su desarrollo.

BIBLIOGRAFIA

Bireka, H. and A. Miller.:

1974. Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indolacetic acid and ethylene effects. *Plant Physiol.* Vol. 53, pp. 569-574.

Burris, R.H.:

1960. Hydroperoxidases. En: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Berlin, Springer Verlag, Vol. 12A, p. 365.

Chamberlain, C.J.:

1919. The living Cycads. The University of Chicago Press., Chicago. Illinois.

Chapel, T., L. Iglesias, A.Barreto, F.Baisre and J.P.Simon.:

1974. A Simplified Apparatus for Vertical Slah Electrophoresis in Polyacrylamide Gel. *Lab. Practice*, Vol. 23. pp. 311-312.

Coulter, J.M. and C.J.Chamberlain.:

1901. Morphology of Spermatophytes. D. Appleton and Company, New York. pp. 1-34.

Cunningham, B.A., G.H. Liang, R.M.Moore and E.G. Heyne.:

1975. Peroxidase activity in near-isogenic height lines of Triticale. *J. Hered.*, Vol. 66, pp. 151-154.

Farkas, G.L. and M.A. Atahmann.:

1966. In the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. *Phytopatho*

- logy, Vol.56, pp. 669-677.
- Fox, L.R., H.I.Nakada and W.K.Purves.:
1964. Degradation of auxin. *Plant Physiol. Sppl.*, p. 16.
- Galston, A.W., J.Bonner and R.S.Baker.:
1953. Flavoprotein and peroxidase as components of the indolacetic acid oxidase system of peas. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol.42, pp. 456-470.
- Galston, A.W., S.Lavee and B.Z.Siegel.:
1967. The induction and repression of peroxidase isoenzymes by 3-indolacetic acid. En: F. Wightman and G.Setterfield (eds.) *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*, pp.455-472.
- González, S.:
1980. Evaluación de peroxidasas durante la maduración del fruto de la piña, C.V. Española Roja. *Rev. Jardín Botánico Nacional*, Vol. I, Nº 2-3, pp.115-123.
- Gortner, W.:
1965. Chemical and Physical Development of the Pineapple Fruit IV - Plant Pigment Constituents. *J. Food Sci.*, Vol. 30, pp.30-32.
- Hamill, D.E. and J.L.Brewbaker.:
1969. Isoenzyme polymorphism in flowering plants IV. The peroxidase isoenzymes of maize (*Zea mays*). *Physiol. Plant*, Vol. 22, pp.945-958.
- Higuchi, T.:
1957. Peroxidase. *Physiol. Plantarum*, Vol. 10, p.621.

- Johnson, L.B. and B.A.Cunningham.:
1972. Peroxidase activity in healthy and leaf-rust infested wheat leaves. *Phytochemistry*, Vol.11, pp.547-551.
- Kochba, J.S., S.Lavee and P. Spiegel-Roy.:
1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic Shamout, orange ovular callus lines, *Plant and Cell Physiol.*, Vol.18, pp.463-467.
- Ku, H.S., S.P.Yang and H.K.Pratt.:
1970. Ethylene Production and Peroxidase Activity during Tomato Fruit Ripening. *Plant Cell Physiol.*, Vol.11, pp.241-246.
- Markert, C.L. and F.Moller.:
1959. Multiple forms of enzymes; tissue onto genetic and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 45, pp.753-763.
- Mc Cune, D.C.:
1961. Degradation of auxin and peroxidase activity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol.94, p.723.
- Prakash, S., R.C.Lewontin and J.L.Hubby.:
1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations, IV. Patterns of genic variation in central, marginal, and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, Vol.61, pp.841-858.

Ray, P.M.:

1958. Peroxidase activity. Ann. Rev. Plant Physiol., Vol.9, p.81.

Raymond, S.:

1964. Acrylamide gel electrophoresis. Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol.121, pp.350-365.

Rudolph, K. and M.A.Stahmann.:

1964. Interactions of peroxidases and catalasis between *Phaseolus vulgaris* and *Pseudomonas phaseolicata* (Halo blight of bean). Nature, Vol.201, pp.474-475.

Scandalids, J.G.:

1974. Isoenzymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol., Vol.25, pp.225-258.

Shannon, L.M.:

1968. Plant isoenzymes. Ann. Rev. Plant Physiol., Vol.19, pp.187-210.

Siegel, B.Z.:

1953. Peroxidases. Phytom., Vol. 18, pp. 34-36.

Siegel, B.Z. and A.W. Galston.:

1967. The isoperoxidases of *Pisum sativum*. Plant Physiol., Vol. 42, pp.221-226.

Recibido: 10 de junio de 1983.